

Tom Tobias Fischer

Dr. med.

Neuronal Calcium Sensor 1-Dependent Signaling in Wolfram Syndrome and Cognitive Impairment

Fach/Einrichtung: Pharmakologie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Marc Freichel

Intrazelluläre Kalzium (Ca^{2+})-Signalwege kontrollieren zahlreiche grundlegende biologische Prozesse und sind auf die korrekte Funktionsweise einer komplexen molekularen Maschinerie angewiesen. Störungen dieser Signalkaskaden sind ursächlich für viele Krankheitsbilder, und die Wiederherstellung der Ca^{2+} -Homöostase ist ein therapeutischer Ansatzpunkt für zahlreiche Erkrankungen. Neuronal Calcium Sensor 1 (NCS1) ist ein ubiquitär exprimiertes Ca^{2+} -Sensorprotein, dessen zelluläre Funktionen bisher wenig verstanden sind. Vorarbeiten zeigen, dass NCS1 wesentlich zur Regulation von Ca^{2+} -Signalwegen und Zielproteinen wie dem Ca^{2+} -Kanal Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor (InsP3R) im endoplasmatischen Retikulum (ER) beiträgt. Der Knockout des *Ncs1* Gens in Mäusen führt zu kognitiven und affektiven Störungen. Beim Menschen sind fehlerhafte NCS1-Expression und -Funktion mit verschiedenen Erkrankungen assoziiert, darunter die Autismus-Spektrum-Störung, die bipolare Störung und jüngst das Wolfram-Syndrom. Vor diesem Hintergrund zielte diese Dissertation darauf ab, NCS1-abhängige Signalwege im Kontext des Wolfram-Syndroms und der kognitiven Beeinträchtigung genauer zu untersuchen.

Das Wolfram-Syndrom ist eine seltene monogene Erkrankung, die durch juvenilen Diabetes mellitus und progressive Neurodegeneration gekennzeichnet ist. Die Erkrankung führt häufig zum vorzeitigen Tod, da es bisher keine wirksame Behandlung gibt. Das Wolfram-Syndrom wird durch pathogene Varianten im *WFS1*-Gen, das für das ER-Transmembranprotein Wolframin (WFS1) kodiert, verursacht. In dieser Arbeit wurde ein neuartiges CRISPR-Cas9-basiertes *in vitro* Modell pankreatischer β -Zellen mit *Wfs1*-Knockout (*Wfs1*^{-/-}) im Vergleich zum *Wfs1*-Wildtyp (*Wfs1*^{+/+}) untersucht. *Wfs1*^{-/-} β -Zellen wiesen eine signifikante Störungen der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase auf. Ca^{2+} -Imaging zeigte – konsistent mit der kürzlich entdeckten WFS1/NCS1/InsP3R Signalachse – eine reduzierte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER sowie reduzierten Ca^{2+} -Transfer zwischen ER und Mitochondrien in *Wfs1*^{-/-} Zellen. Gegenüber Glukosetoxizität zeigten *Wfs1*^{-/-} Zellen eine weitere Aggravation der Ca^{2+} -Dysregulationen und verstärkten Zelltod. Darüber hinaus führte der Verlust von WFS1 zu einer signifikanten Abnahme der Glukose-stimulierten Insulinsekretion. Umgekehrt konnte NCS1-Überexpression InsP3R-abhängige Ca^{2+} -Signale und die Ca^{2+} -Homöostase in *Wfs1*^{-/-} Zellen wiederherstellen. Die Testung von Wirkstoffkandidaten, die NCS1- und Ca^{2+} -Signalwege modulieren, ergab, dass Ibudilast und Calpain Inhibitor XI die Ca^{2+} -Homöostase, Zellviabilität

und Insulinsekretion in *Wfs1*^{-/-} Zellen wiederherstellen können. Da Ibutilast bereits für andere Erkrankungen klinisch zugelassen ist, ist es ein vielversprechender Kandidat für weitere Untersuchungen und Drug Repurposing. Insgesamt tragen diese Ergebnisse zu einem besseren Verständnis des Wolfram-Syndroms bei, zeigen eine erste auf den WFS1/NCS1/InsP3R-Signalweg abzielende Therapiestrategie auf und könnten aufgrund des Modellcharakters dieser monogenen Erkrankung Implikationen für Diabetes und Neurodegeneration im Allgemeinen haben.

Kognitive Beeinträchtigung ist ein Leitsymptom vieler neurologischer Erkrankungen. Um NCS1-abhängige Signalwege in diesem Zusammenhang besser zu verstehen, wurde eine systematische Analyse von Mäusen mit globalem *Ncs1*-Knockout (*Ncs1*^{-/-}), für die kognitive Defizite in Vorarbeiten beschrieben wurden, durchgeführt. Auf morphologischer Ebene konnte mittels Golgi-Cox-Färbungen eine signifikante Verringerung der dendritischen Komplexität, der Dendritengesamtlänge und der Dornendichte im dorsalen Hippocampus und präfrontalen Kortex in *Ncs1*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu *Ncs1*^{+/+}-Mäusen beobachtet werden. Eine vollständige Transkriptomanalyse von *Ncs1*^{-/-}-Gehirngeweben zeigte, dass NCS1 Zellmorphologie, Zell-zu-Zell-Kommunikation und Entwicklung des zentralen Nervensystems auf Transkriptionsebene moduliert. Eine mögliche Funktion von NCS1 in der Gehirnentwicklung wurde durch Data-Mining-Analysen von Expressionsdatensätzen, die den zeitlichen Verlauf der Organentwicklung abdecken, unterstützt. Zusammenfassend entschlüsseln diese Ergebnisse molekulare und morphologische Mechanismen der kognitiven Defizite von *Ncs1*^{-/-}-Mäusen. Ähnliche Mechanismen wurden für kognitive Beeinträchtigungen in anderen Mausmodellen NCS1-assoziiierter Erkrankungen beschrieben, sodass *Ncs1*^{-/-}-Mäuse ein geeignetes Modell zur Untersuchung der Rolle von NCS1 in neurologischen Erkrankungen darstellen. Da beim Wolfram-Syndrom sowohl eine gestörte Gehirnentwicklung als auch Neurodegeneration auftreten, unterstreicht die hier beschriebenen Funktionen von NCS1 die funktionelle Redundanz von WFS1 und NCS1 und das Potential von NCS1 als therapeutische Zielstruktur für das Wolfram-Syndrom.

Insgesamt trägt diese Dissertation zu einem verbesserten Verständnis von NCS1 in Physiologie und Pathophysiologie bei und hebt seine unverzichtbare Funktion in Neuronen und pankreatischen β -Zellen sowie sein Potenzial als therapeutische Zielstruktur hervor.